

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie im
Zentralklinikum Augsburg

Vorstand: Prof.Dr.Dr.med.habil. B.-R. Balda

E I N L A T E X - A G G L U T I N A T I O N S -
T E S T Z U M N A C H W E I S V O N
S M - A N T I K Ö R P E R N

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dai Yulin

aus
Fujian, China

Jahr
1987

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie im
Zentralklinikum Augsburg

Vorstand: Prof.Dr.Dr.med.habil. B.-R. Balda

E I N L A T E X - A G G L U T I N A T I O N S -
T E S T Z U M N A C H W E I S V O N
S M - A N T I K Ö R P E R N

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dai Yulin

aus
Fujian, China

Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

BERICHTERSTATTER: Prof.Dr.Dr.med.habil. B.-R. Balda

MITBERICHTERSTATTER: Prof.Dr.Dr.h.c. O. Braun-Falco

DEKAN: Prof.Dr.Dr.h.c. W. Spann

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 14.05.1987

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Glossar	5
1. Einleitung und Fragestellung	7
2. Material und Methoden	10
2.1. Material	10
2.1.1. Sera	10
2.1.2. Antigene	10
2.1.3. Latex	11
2.1.4. Trypsin	11
2.1.5. Phosphatpuffer	11
2.2. Methoden	12
2.2.1. Koppelung des Antigens	12
2.2.2. Methodik des Latex-Agglutinationstests	12
2.2.3. Doppel-Immundiffusion	13
3. Ergebnisse	13
3.1. Die Ergebnisse des Latex-Agglutinationstests	13
3.2. Charakterisierung der Antigene	18
4. Diskussion	20
4.1. Antigen	20
4.1.1. Kalbsthymusextrakt	20
4.1.2. Physikalische Eigenschaften des Sm-Antigens	22
4.1.3. Biochemische Eigenschaften des Sm-Antigens	22
4.1.4. Die Bezeichnung ENA	24
4.1.5. Ursprungsgewebe des Sm-Antigens	26
4.2. Methoden	26
4.2.1. Vergleich der Methoden zum Nachweis von Sm-Antikörpern	26
4.2.2. Sensitivität und Spezifität der Methode	28
4.2.3. Beschichtungsbedingungen	28

	Seite
4.3.	Klinische Bedeutung 29
4.3.1.	Sm-Antikörper und andere Erkrankungen 29
4.3.2.	Die Beziehung zwischen Sm-Antikörper und Aus- maß der klinischen Organbeteiligung bei SLE 29
4.3.3.	Beziehung zwischen ANA und CTD 31

Zusammenfassung	35
-----------------	----

Literatur	36
-----------	----

Danksagung	43
------------	----

Lebenslauf	44
------------	----

Glossar

ANA (ANF):	Antinukleäre Antikörper (Antikörper gegen Zellkernantigene)
ARA:	American Rheumatism Association
CIE:	Counterimmuno-electrophoresis (Gegenstromimmunoelektrophorese)
CTD:	Connective Tissue Disease (Bindegewebserkrankung)
DID:	Doppelimmunodiffusion
DNS:	Desoxyribonukleinsäure
DNP:	Desoxyribonukleoprotein
ds-DNS:	Doppelstrang-DNS
ELISA:	Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (heterogener Enzymimmunoassay)
ENA:	Extrahierbares nukleäres Antigen
FTA:	Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorptions-Test
Ha:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
IIF:	Indirekte Immunfluoreszenz
Jo-1:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
KD:	Kilo-Dalton
Ku:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
La:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
LE:	Lupus erythematoses
Ma:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
MCTD:	Mixed Connective Tissue Disease (gemischte Bindegewebserkrankung)
Mi-1:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
Mo:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
NAPA:	Nuclear Acidic Protein Antigen
PB:	Phosphatpuffer
PBS:	Phosphatpuffer mit Natriumchlorid
PHA:	Passive Hämagglutination
PM-1:	Kernantigen, benannt nach Krankheitsbild Polymyositis
RIA:	Radioimmunoassay

RNP:	Ribonukleoprotein (bestimmtes Kernantigen. Synonyme: Mo, n-RNP, sn-RNP, U1-RNP, U1-n-RNP, U1-sn-RNP)
RNS:	Ribonukleinsäure
Ro:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
Scl-70:	Kernantigen, Benennung nach Krankheitsbild (Sklerodermie, Molekulargewicht 70 Kilo-Dalton)
SLE:	Systemischer Lupus erythematodes
Sm:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen Smith
SS-A:	Kernantigen, Benennung nach Krankheitsbild (Sjögren-Syndrom)
SS-B:	Kernantigen, Benennung nach Krankheitsbild (Sjögren-Syndrom)
SS-C:	Kernantigen, Benennung nach Krankheitsbild (Sjögren-Syndrom)
Su:	Kernantigen, Benennung nach Patientennamen
TPI:	Treponema-pallidum-Immobilisationstest
U-RNS:	RNS, die sich durch hohen Uridylsäure-Gehalt auszeichnet
VDRL:	Venereal-Disease-Research-Laboratory

1. Einleitung und Fragestellung

1948 wurden von Hargraves et al (17) im heparinisierten Sternalmark von Patienten mit LE eine besondere Zelle entdeckt, die in die wissenschaftliche Literatur als LE-Zelle eingingen. Bereits kurze Zeit später wurde der sog. LE-Faktor gefunden (19), der schließlich als Antikörper gegen DNP identifiziert werden konnte (20).

Im Jahre 1957 berichteten Robbins et al., Cepellim et al., Seligmann und Miescher et al. fast gleichzeitig und unabhängig voneinander, daß Seren von Patienten mit SLE mit DNS reagierten (Übersicht bei 65). Es wurde versucht, Beziehungen zwischen ds-DNS-Antikörpern und der Pathogenese, den klinischen Erscheinungen sowie der Prognose des SLE, insbesondere bei Nierenbeteiligung, herzustellen (33,53,55,65). 1966 berichteten Tan et al. (63) von Sm-Antikörpern, die man zu 75 % in Seren bei Patienten mit aktivem SLE bestimmen konnte. Dieser Antikörper findet sich fast ausschließlich beim SLE und wird daher als "Marker"-Antikörper gewertet (16,42). 1972 beschrieben Sharp et al. (56) eine neue Variante der Kollagenosen, nämlich die gemischte Bindegeweberkrankung (MCTD). Patienten mit dieser Erkrankung zeichneten sich durch die serologische Eigenschaft aus, hohe Antikörpertiter ($1:10^3$ - $1:10^6$, passive Hämagglutination) gegen RNP zu besitzen.

In der IIF fand sich ein gesprenkeltes Fluoreszenzmuster im Bereich der Zellkerne, woraus geschlossen wurde, daß es sich bei den Sm- und RNP-Antikörpern um Non-Histon-nukleäre Proteine handeln könnte (68).

Schließlich kristallisierten sich für die klinische Routinediagnostik ANA heraus, die 1982 wie folgt in der American Rheumatism Association zur Klassifikation des SLE (Tab. 1) herangezogen wurden (66):



Tab. 1. Revidierte ARA-Kriterien für die Klassifikation des SLE (1982, Auszug)

<u>Kriterium</u>	<u>Definition</u>
Immunologische Störungen	a) positiver LE-Zell-Nachweis oder b) Anti-DNS-Antikörper gegen native DNS in pathologisch erhöhten Titern oder c) Anti-Sm-Antikörper gegen das Sm-Nukleoprotein oder d) biologisch falsch positiver serologischer Syphilitest über mindestens 6 Monate, dessen Ergebnis durch den negativen TPI oder negativen FTA widerlegt wird
Antinukleäre Antikörper	pathologisch erhöhte Titer von antinukleären Antikörpern, die zu einem beliebigen Zeitpunkt durch Immunfluoreszenz oder einen gleichwertigen Assay nachgewiesen werden (wobei die Einnahme von Medikamenten, die ein "arzneimittelinduziertes Lupus-Syndrom" auslösen können, ausgeschlossen ist)

Dadurch konnten LE und LE-ähnliches Syndrom voneinander getrennt sowie klinische Diagnose und Laborparameter verschiedener Länder untereinander verglichen werden. Voraussetzung war natürlich, daß die Bestimmungen der immunologischen Parameter leicht, praktikabel, schnell durchführbar und wenig aufwendig sein mußten. Das trifft für den biolo-

gisch falsch positiven serologischen Syphilistest und den nukleären Antikörpernachweis mit dem VDRL-Test in der IIF zu. Anstelle des positiven LE-Zellnachweises kann man den DNP-Latex-Agglutinationstest verwenden.

Von uns wurde mit Hilfe von DNP-Antigen aus Schweinethymus ein Latex-Test als DNP-Antikörpernachweis entwickelt (11). Die Ergebnisse zeigen eine hohe Korrelation mit dem Reagens der Ames Corp., USA ($r=96,3\%$). Die ARA-Kriterien legen die Art des Testsystems zum Nachweis von DNS-Antikörpern nicht fest. So sind beispielsweise durchaus gebräuchliche und einfache Verfahren die Crithidia-luciliae-Methode von Aarden (1) und die Trypanosoma-equiperdum-Methode von Xu Shi-zheng et al. (76). Weil Kinetoplasten von Crithidia luciliae und Trypanosoma equiperdum, die als Substrat angewendet werden, RNS- und Histon-haltig sind (6,12,59), stellen sie allerdings kein eigentliches spezifisches Substrat für den Nachweis der ds-DNS-Antikörper dar. Schlechterdings ist es auch unmöglich, daß Kinetoplasten von Hämoflagellaten keine RNS enthalten. Dies wurde nur fälschlicherweise in der älteren Literatur angenommen (76).

Ferner wurde von uns ein IIF-Imprint-Verfahren mit einer Aceton- und Salzsäure-behandelten Mäuseleber als Substrat zum Nachweis von ds-DNS-Antikörpern vorgeschlagen (9). Die klinische Anwendbarkeit ist besser als beim Crithidia-luciliae- und Trypanosoma-Equiperdum-Verfahren und ähnlich wie bei dem Präzipitations-Radioimmuno-Assay nach Farr (74). Ausserdem ist dieses Verfahren einfacher und leichter durchzuführen.

Bei Struckmann (61), der mit einer ELISA-Methode zum Nachweis von Sm-Antikörpern arbeitet, findet sich der Hinweis, daß das Sm-Antigen auf eine Polystyrolmikrotiterplatte geschichtet werden kann. Auf immunologischem Gebiet weit verbreitet (24,38,46) ist zudem ein Latex-Agglutinationstest, der bereits 1956 von Singer und Plotz vorgestellt wurde

(58). Da Latex auch aus Polystyrol besteht, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht zum Nachweis von Sm-Antikörpern einen einfachen Latex-Agglutinationstest zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Sera

Proben: Sie wurden uns vom Institut für Laboratoriumsmedizin im Zentralklinikum Augsburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. Wagner) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um Sera von 70 Patienten mit Verdacht auf entzündliche rheumatische Erkrankungen. Durch Immundiffusion waren bereits folgende Parameter bestimmt worden: RNP viermal, SS-A und RNP einmal, Sm und RNP einmal, SS-A einmal. Die übrigen 63 Sera waren diesbezüglich negativ.

Diese von Januar bis April 1986 entnommenen Blutproben wurden zur Bestimmung der Sm-, RNP-, SS-A-, SS-B-Antikörper herangezogen. Die Sera wurden bis zur Untersuchung bei -20°C eingefroren.

Sm-, RNP-, SS-B-positive Kontrollsera wurden von der BIOS GmbH, München bezogen (Lot: Sm 6563 und 6770, RNP 6617, SS-B 6649). Diese Sera wurden ebenfalls bis zur Untersuchung bei -20°C eingefroren.

2.1.2. Antigene

ENA-Kalbsthymusextrakt U1-RNP-, Sm- und (SS-B-) haltig, gefriergetrocknet, gepuffert und stabilisiert, gleichfalls von der BIOS GmbH, München (Lot: 6607).

2.1.3. Latex

Latex-Polystyrol-Partikel, Durchmesser $0,65-0,70\mu$, wurden vom Forschungsinstitut für biologische Erzeugnisse, Beijing, Volksrepublik China kommerziell erworben.

2.1.4. Trypsin

Bovines Pankreas-Trypsin, III-S-Typ, wurde von der Firma Sigma, USA ebenfalls kommerziell erworben (Lot: 65F-8190).

2.1.5. Phosphatpuffer

0,01 M PBS, pH 7,1 und 0,066 M PB, pH 6,5 entsprechen folgender Zusammensetzung:

NaCl	42,5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$	6,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$	1,35 g

Aqua dest. ad 5000,0 ml

Einstellung mit 1N Salzsäure pH 7,1

und

KH_2PO_4	0,64 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,35 g

Aqua dest. ad 100,0 ml. pH 6,5

2.2. Methoden

2.2.1. Koppelung des Antigens

1ml Latexpartikel plus 9 ml Aqua dest., davon 1ml
plus 0,2ml PB, pH 6,5

plus

1 Flasche des handelsüblichen Antigens plus 0,25 ml
Aqua dest.

↓
56°C Wasserbad 1 Stunde, alle 15 min
einmal schütteln

↓
Zentrifugation bei 3000 Upm während 45 min

↓
Antigenhaltiger Überstand
kann noch zweimal benützt
werden, jeweils nach Wie-
derholung der Prozedur

↓
plus 0,01 M PBS, pH 7,1 bis
zur Gesamtmenge von 1,45 ml
↓
plus 1,5 mg Natriumazid
haltbar im Kühlschrank bei 4°C,
vor Gebrauch schütteln.

2.2.2. Methodik des Latex-Agglutinationstests

Ein Tropfen Serum wird auf einen Objektträger gebracht, und dazu wird ein Tropfen Latex-Reagens gegeben. Die Mischung wird mit einem Zahnstocher auf einer Fläche von Zehnpfennigstückgröße verteilt, und anschließend werden 2 - 3 min lang vorsichtige Kippbewegungen durchgeführt. Dann wird das Präparat abgelegt. Nach 10 - 15 min kann das Ergebnis unter dem Mikroskop abgelesen werden. Auch dann, wenn die Latexpartikel eingetrocknet sind, ist unter dem Mikroskop noch eine Beurteilung möglich.

Positives Serum und ein Leerlatex-Objektträger sollten zur Kontrolle mitlaufen.

Bewertungsskala:

- Negativ: Keine Agglutination (Abb. 1)
Einfach positiv: Geringe, jedoch zweifelsfreie Agglutination (Abb. 2)
Zweifach positiv: Stärkere Agglutination als einfach positiv (Abb. 3)
Dreifach positiv: Ausgeprägte Agglutination (Abb. 4)
Vierfach positiv: Maximale Agglutination (Abb. 5).

2.2.3. Doppel-Immundiffusion

Dieser Test wurde entsprechend der Gebrauchsanleitung der Firma BIOS GmbH, München durchgeführt. Beim Hitzestabilitäts- und Enzymempfindlichkeitstest des Antigens werden die zentrale Auftragstelle mit dem Kontrollserum gefüllt, die periphere Auftragstelle mit dem behandelten Antigen.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse des Latex-Agglutinationstests

In Voruntersuchungen mit Sm-positiven Kontrollsera wurden die hergestellten Latex-Reagentien auf ihre Reagibilität hin kontrolliert, d.h. es wurden pro Flasche drei Bestimmungen ausgeführt, da die Überstände einer Flasche noch zweimal benutzt werden können. Die Ergebnisse von drei derartigen Latex-Reagentien als Vorproben waren 1. dreifach, 2. zwei- bis dreifach und 3. dreifach positiv. Deshalb konnten jeweils die drei Latex-Reagentien für die nachfolgenden Bestimmungen gemischt werden.

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2. Ergebnisse des Latex-Agglutinationstests

Sera		Reaktionsausfall des Latex-Reagens	Anzahl
Positive Kontrollen	Proben		
Sm		+++	2
RNP		-	1
SS-B		-	1
	Sm und RNP	++	1
	RNP	-	4
	SS-A und RNP	-	1
	SS-A	-	1
	negativ	-	63



Abb. 1. Negativer Latex-Test. Leitz (Vario-Orthomat) x 63.

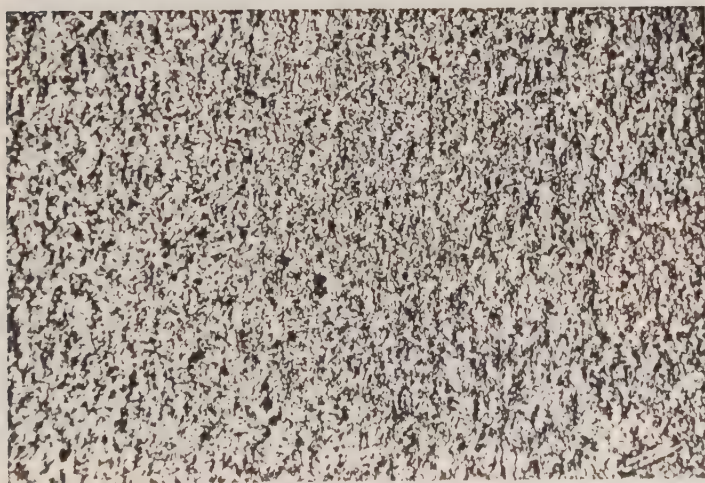


Abb. 2. Einfach positiver Latex-Test. Leitz (Vario-Orthomat) x 63.

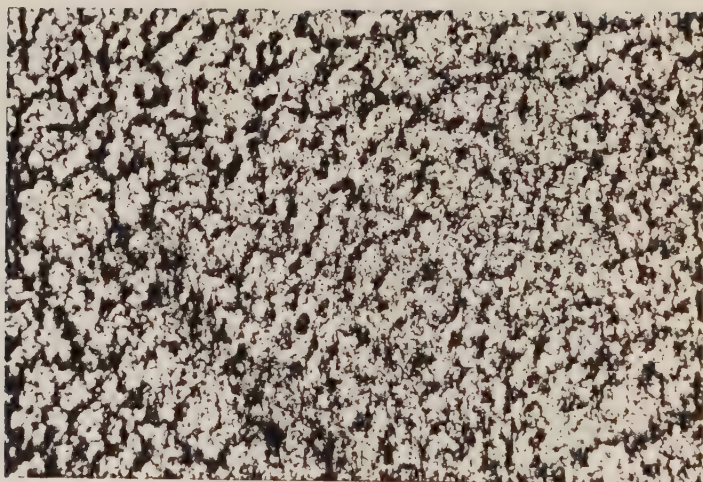


Abb. 3. Zweifach positiver Latex-Test. Leitz (Vario-Orthomat) x 63.



Abb. 4. Dreifach positiver Latex-Test. Leitz (Vario-Orthomat) x 63.

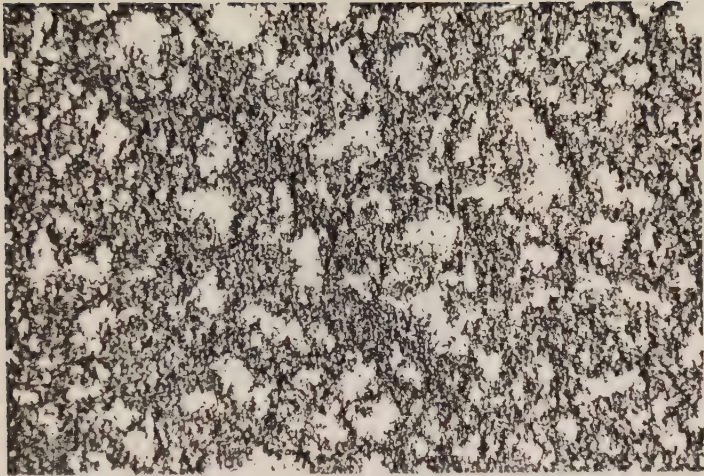


Abb. 5. Vierfach positiver Latex-Test. Leitz (Vario-Orthomat) x 63.

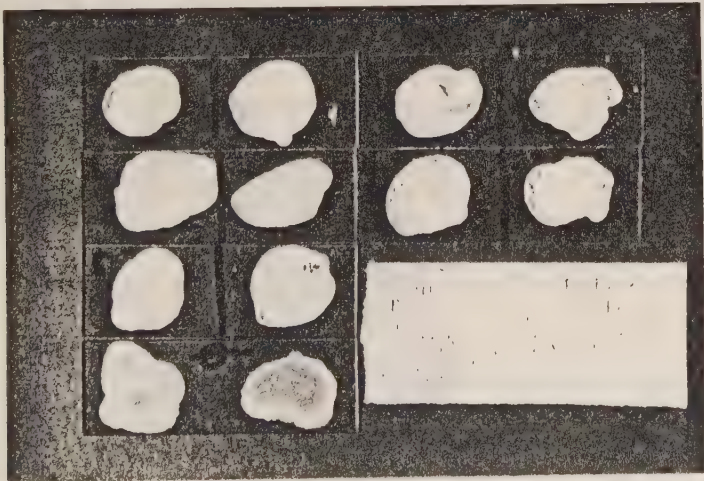


Abb. 6. Sm-positive Kontrollsera sind bis zu einem Titer von 1 : 2560 nachweisbar. Unten zwei Leerlatex-Kontrollen.

Alle zwei Wochen wurde mit dem Sm-positiven Kontrollserum das Latex-Reagens auf seine Haltbarkeit hin überprüft. Es zeigte sich, daß das Latex-Reagens mindestens fünf Monate benutzt werden kann.

Die Empfindlichkeit des Testsystems liegt mit Sm-positiven Kontrollsera bei einem Titer von 1 : 2560 (Abb. 6).

3.2. Charakterisierung der Antigene

Wird das Antigen bei 56°C eine Stunde lang behandelt, so verschwindet die SS-B-Präzipitationslinie (Abb. 7).

Wird das Antigen bei 56°C drei Stunden lang behandelt, so ist die Sm-Präzipitationslinie immer noch nachweisbar. Sie verschwindet unter diesen Bedingungen erst nach fünf Stunden (Abb. 8).

Erwartungsgemäß ist die Sm-Präzipitationslinie auch nicht mehr nachweisbar, wenn das Antigen bei 37°C eine Stunde lang mit Trypsin behandelt wird (keine Abb., da gleiches Bild wie Abb. 7).

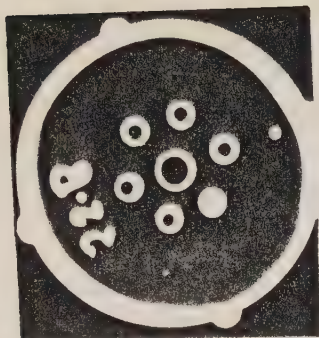


Abb. 7. Latex-Agglutinationstest. Antigenbehandlung eine Stunde lang bei 56°C . SS-B-Präzipitationslinie (Auftragstelle 2) nicht mehr nachweisbar. Die Kontrolle (unbehandeltes Antigen, Auftragstelle 1) zeigt die typische Präzipitationslinie. Zentrale Auftragstelle mit SS-B-Kontrollserum gefüllt.

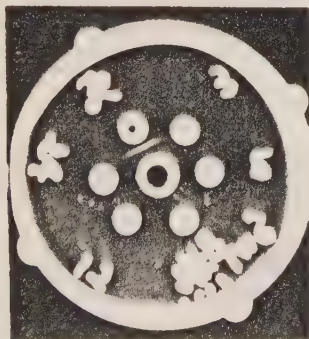


Abb. 8. Latex-Agglutinationstest. Antigenbehandlung drei Stunden lang bei 56°C . Sm-Präzipitationslinie noch nachweisbar (Auftragstelle 2). Nach fünfstündiger Inkubation bei 56°C Verschwinden der Sm-Präzipitationslinie (Auftragstelle 3). Zentrale Auftragstelle mit Sm-Kontrollserum gefüllt.

4. Diskussion

4.1. Antigen

4.1.1. Kalbsthymusextrakt

Nach Angaben der BIOS GmbH, München enthält deren Kalbsthymusextrakt U1-RNP-, Sm- und (SS-B-) Antigene. Einstündige Hitzebehandlung von 56° C inaktiviert bekanntermaßen das hitzeempfindliche RNP-Antigen (34). Da das SS-B-Antigen jedoch hitzestabil ist (3) und wir in diesem Testsystem keine SS-B Antikörper nachweisen konnten, liegt die Vermutung nahe, daß der Kalbsthymusextrakt nur Ha-/La-Antigen-haltig ist. Ha-/ La-Antigen und SS-B-Antigen sind nämlich immunologisch identisch, physikalisch und biochemisch allerdings verschieden (5). Ha-/La-Antigen wird bereits durch 30minütige Hitzeanwendung bei 56° C inaktiviert (3, 36, 52) (Tab. 3).

Zur Untermauerung unserer Annahme führten wir als immunologischen Test Doppel-Immundiffusionsläufe mit hitzebehandeltem Antigen und SS-B positiven Kontrollserum durch. Es kam zu keinen Präzipitationslinien, sondern lediglich beim unbehandelten Antigen.

Tab. 3. Physikalische und chemische Beeinflussung der Antigenität von SS-B sowie Ha-/ La-Antigen

	SS-B	La	Ha
56 °C	stabil	empfindlich < 30 min	empfindlich < 30 min
Trypsin	empfindlich	empfindlich	empfindlich
RNase	stabil	empfindlich	stabil
DNase	stabil	stabil	stabil

Dieses Ergebnis legt die Richtigkeit unserer Vermutung nahe. Kalbsthymusextrakt ist Ha-/La-Antigen-haltig ist. Entsprechende Hinweise finden sich auch in der Literatur (31,36,65).

Somit wurde die Oberfläche der Latex-Partikel nach der Hitzebehandlung nur mit Sm-Antigenen beschichtet.

Natürlich beinhaltet Kalbsthymusextrakt vielleicht noch andere PBS-extrahierbare nukleäre Antigene, z.B. PM-1 (75) Scl-70 (64), Mi-1 (41,48), Jo-1 (40), Ku (37), Ma (72), Su (69). Diese werden aber bei einstündiger Hitzeanwendung von 56°C inaktiviert (Tab. 4). Deshalb haben sie keinen Einfluß auf die Bestimmung der Sm-Antikörper.

Tab. 4. Physikalische und biochemische Eigenschaften von Non-Histon-Protein-Antigenen. Molekulargewicht (Mg) in KD

	Scl-70	PM-1	Mi-1	Jo-1
Mg	70	-	150	150
Trypsin	empfindlich	empfindlich	empfindlich	empfindlich
RNase	stabil	stabil	stabil	stabil
DNase	stabil	stabil	stabil	stabil
56°C	empfindlich	empfindlich	empfindlich	empfindlich

	Ku	Ma	Su
Mg	300	-	150
Trypsin	empfindlich	empfindlich	empfindlich
RNase	stabil	stabil	stabil
DNase	stabil	stabil	stabil
56°C	empfindlich	empfindlich	empfindlich

Das Non-Histon-Nukleär-Antigen SS-A (Ro) ist ebenfalls gegenüber einer Hitzebehandlung von 56°C resistent, aber nur in menschlichen Zellen und Affen- oder Hundemilz, nicht jedoch in Kalbsthymusextrakt vorhanden (3,65).

4.1.2. Physikalische Eigenschaften des Sm-Antigens

Das Sm-Antigen ist hitzebeständig bei ein- oder mehr als einstündiger Behandlung von 56°C (29,63,65). Durch Doppel-Immundiffusion mit hitzebehandeltem Kalbsthymusextrakt zeigte sich, daß das Sm-Antigen bei 56°C über drei Stunden hitzestabil ist und erst nach fünfstündiger Inkubation bei 56°C vollständig denaturiert wird, obwohl das Sm-Antigen sich jeweils nur in Spuren an Latex bindet. Das steht im Gegensatz zur Literatur, nach der das Sm-Antigen nach sechsständiger Hitzebehandlung bei 56°C stabil sein soll (72). Nach unseren Ergebnissen kann aber der Kalbsthymusextrakt nur dreimal benützt werden.

4.1.3. Biochemische Eigenschaften des Sm-Antigens

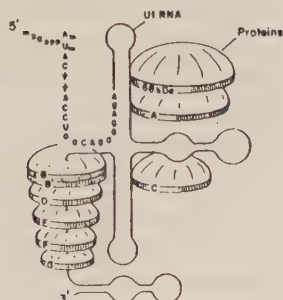
Über die Trypsin-Empfindlichkeit des Sm-Antigens gibt es verschiedene Berichte:

1. Trypsin-Resistenz (25,63,65),
2. partielle Trypsin-Empfindlichkeit (29,56,65),
3. Trypsin-Empfindlichkeit (31,44).

In Anlehnung an die Erfahrungen mit dem Latex-Schwangerschaftstest inkubierten wir unsere Sm-Präparationen zunächst mit Trypsin, um eine höhere Reaktionsempfindlichkeit zu erzielen. Das Ergebnis war unerwartet, denn das Sm-Antigen wurde durch die Trypsin-Behandlung zerstört.

Die Struktur des Sm-Antigens ist grundsätzlich bekannt (Abb. 9) (18). Es besteht aus fünf U-RNS-Molekülen (U1, U2, U4, U5, U6) und neun Proteinen (A, A', B, B', C, D, E, F, G) (43,47). Wie bereits im Glossar erklärt, zeichnet sich U-RNS durch einen hohen Gehalt an Uridylsäure aus. Bisher sind sechs Typen dieser U-RNS bekannt (Tab.5), deren Nukleotidsequenzen aufgeklärt wurden (52).

Abb. 9. Sm-U1-RNP-Komplex



Tab. 5. Charakteristika der U-RNS

RNS	Subtypen	Nukleotide
U1	2	165
U2		189
U3	3	216
U4		139
U5		118
U6		107

Die Proteine mit jeweils bekanntem Molekulargewicht bestehen aus 17 verschiedenen Aminosäuren (Tab. 6).

Tab. 6. Sm-Antigen-Proteinanteil und deren Mg in Kilo-Dalton

Proteine	A	A'	B	B'	C	D	E	F	G
Molekulargewichte	30	25	23	22	18	12	10	9	8

Das Sm-Antigen existiert in zwei molekularen Formen:

1) als gebundenes Sm-Antigen in einem Sm-U1-RNP-Komplex (Abb. 9) sowie 2) als freies Sm-Antigen (52,62). Die Antikörper richten sich nicht gegen die RNS der Partikel, sondern gegen deren Proteinanteil (52,62). RNS als Stabilisator ist für die Antigen-Determinanten nicht notwendig. Folglich sollte das Sm-Antigen Trypsin-empfindlich sein, weil die Antigenität Protein-abhängig ist. Alle Non-Histon-nukleär-Antigene weisen Trypsin-Empfindlichkeit auf (Tabb. 3,4), nur das Sm-Antigen soll nach Reihsein et al. (49) Trypsin-resistent sein. Das ist schwierig zu verstehen. Da Trypsin nur Lysin- und Argininbindungen spaltet (23), vermuteten diese Autoren, daß die Determinanten des Sm-Antigens nicht im Bereich des Lysins und Arginins liegen.

Von uns konnte mit Hilfe der Doppelimmundiffusionstechnik bewiesen werden, daß tatsächlich das Sm-Antigen empfindlich gegenüber Trypsin ist. Ganz offensichtlich kommt es dabei auf die Reaktionsbedingungen an, denn bei der üblichen Relation von 1 : 25 (Enzym : Substrat) sowie kurzer Reaktionsdauer und niedriger Temperatur vermag Trypsin das Sm-Antigen nicht zu denaturieren (Seeling (52)). Erst bei höherer Konzentration des Trypsins und noch deutlicher bei längerer Reaktionsdauer sowie höherer Temperatur weist das Sm-Antigen eine zunehmende Trypsin-Empfindlichkeit bis hin zu seiner vollständigen Zerstörung auf.

4.1.4. Die Bezeichnung ENA

Holman et al. (21) stellten erstmals im Jahr 1959 fest, daß es einen bestimmten Autoantikörper bei manchen SLE-Patienten gibt, dessen reagierende Antigene mit neutralen Salzlösungen aus dem Kern extrahiert werden können. Sie wurden als extrahierbare nukleäre Antigene (extractable nuclear antigen, ENA) bezeichnet (22).

Lachmann et al. (1961) (28) entdeckten, daß diese Antikörper ein "speckled" Fluoreszenzmuster hatten.

1966 beschrieben Tan und Kunkel erstmals den Sm-Antikörper (63). Das Antigen des Sm-Antikörpers läßt sich ebenfalls durch neutrale Salzlösungen extrahieren. Deshalb wurde vermutet, daß das Sm-Antigen ein ENA sei.

1971 beschrieben Mattioli et al. (34) den RNP- (Mo-) Antikörper, der auch ein gesprenkeltes Fluoreszenzmuster hatte und dessen reagierende(s) Antigen(e) ebenfalls mit neutralen Salzlösungen extrahierbar ist (sind). Weil die zwei Antigene (Sm und RNP) sehr früh entdeckt wurden, wurden ENA längere Zeit mit diesen gleichgesetzt.

Nach Sharp et al. (56) können ENA manchmal ausschließlich RNP-Antigen sein, z.B. hat MCTD hohe Titer von ENA-Antikörpern ohne Sm-Antikörper.

Durch Salzlösungen extrahierbar sind auch die folgenden Antigene: SS-A (2), SS-B (2), SS-C (2), Scl-70 (64), PM-1 (75), Mi-1 (41,48), Jo-1 (40), Ku (37), Ma (72), Su (69) usw. Sie gehören somit nach der geltenden Nomenklatur zu den ENA. Dennoch zeigen sich Unterschiede. So ist das SS-C-Antigen leichter extrahierbar als es die Sm- und RNP-Antigene sind (4).

Um in diese verwirrte Vielfalt Ordnung zu bringen, schlug Tan (65) vor, daß Sm- und RNP-Antigene, die sich eher als Partikelkomplexe darstellen, dem ENA-Komplex zugerechnet werden sollten. Die Richtigkeit seiner Annahme konnte durch biochemische Studien von Lerner et al. (30) und Mattioli et al. (35) bestätigt werden. Möglicherweise werden zukünftig noch weitere ENA-Komplexe entdeckt werden. Allerdings wird heute angenommen, daß sie den sog. Ro- und La-Antigen-Komplexen (Abb. 10) zugeordnet werden müssen (18).

Wie bereits erwähnt, hat das Sm-Antigen aber auch eine einfache, Nicht-Komplexform (freies Sm-Antigen) (62).

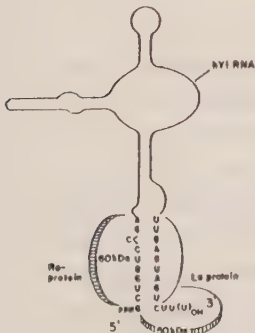
In der deutschsprachigen Literatur gibt es für die ENA-Gruppe folgende Bezeichnungen: NAPA-1 für Sm-Antigen,

NAPA-2 für RNP-Antigen (67).

Bisher wurden aber mehr als 10 verschiedene Arten von NAPA entdeckt (Tabb. 3, 4).

Wir schlagen deshalb vor, die Bezeichnung ENA zu verwerfen, weil diese Nomenklatur zu ungenau ist. Nach unserer Meinung ist es einfacher, die Antigene direkt zu bezeichnen, z. B. Sm-, RNP-Antigene usw. sowie die ganze Gruppe Non-Histon-nukleäre - Protein - Antigene (NHN-PA) zu nennen.

Abb. 10. Ro- und La-Komplex



4.1.5. Ursprungsgewebe des Sm-Antigens

Tan et al. (63) extrahierten das Sm-Antigen aus verschiedenen menschlichen Organen und Kalbsthymus und zeigten damit, daß dieses Antigen tatsächlich in Mammaliergeweben vorhanden ist. Alspaugh et al. (4), Lerner et al. (30) sowie Billings et al. (7) konnten diese Tatsache durch weitere Experimente in zahlreichen anderen Zellsystemen untermauern.

Gegenwärtig werden Handelspräparate von Sm-Antigenen aus dem Kaninchen-oder Kalbsthymus gewonnen. Da beide Thymusarten schwer zu besorgen sind, sind diese Reagentien teuer. Uns gelang es, Sm-Antigen aus Schweinethymus zu isolieren, was nicht nur zu größeren Quantitäten, sondern auch zu einer erheblichen Preisreduzierung des Verfahrens führte. Die Qualität des Produktes wurde durch CIE mit Kaninchenthymuspulver (Fa. Sigma, USA) und Kalbsthymusextrakt in 300 Versuchen kontrolliert. Die Ergebnisse waren stets gleich (77). Unabhängig von uns gelang dieses Verfahren auch MacGillivray et al. (32).

4.2. Methoden

4.2.1. Vergleich der Methoden zum Nachweis von Sm-Antikörpern

Die Methoden zum Nachweis von Sm-Antikörpern sind: 1) IIF (29), 2) DID (25,63) 3) Komplementfixationstest (34,63), 4, PHA (29,42,56), 5) CIE (25,29), 6) ELISA (1,51,61), 7) RIA (7,67). IIF ist zwar technisch relativ einfach durchzuführen, jedoch vergleichsweise unspezifisch. So ergeben auch SS-8, SCL-70 usw. das gleiche gesprenkelte Reaktionsmuster bei Sm-Antigen. Folglich erscheint uns diese Methode nicht ausreichend zuverlässig. DID hat eine geringe Empfindlichkeit (29). Nur auf Grund des Einsatzes von Referenzsera ist die Identifikation von Antikörperspezifitäten möglich (29,

63). Der Komplementfixationstest hat zwar eine größere Empfindlichkeit, doch sind bei Anwesenheit von Antikomplementfaktor falsch positive Reaktionsausfälle möglich. Die Hämagglutinationsmethode ist trotz einer im Vergleich zu den obigen Verfahren deutlich besseren Empfindlichkeit aber als Routineverfahren zum Nachweis des Sm-Antikörpers deshalb nicht gut geeignet, weil die Qualität des gesamten Tests vom Alter der jeweils verwendeten Erythrozyten abhängt. Für CIE werden ein relativ aufwendiges Instrumentarium. Gleiches gilt für den ELISA-Test, der keineswegs so einfach durchführbar ist, wie er beschrieben wurde (61). Auch RIA ist aufwendig und benötigt radioaktiv markierte Substanzen. Eine handelsübliche Präparation von Kalbsthymusextrakt der Fa. Bios GmbH, München erlaubt 35 Serumbestimmungen auf Sm-Antikörpern mit Hilfe der Doppel-Immundiffusionstechnik. Wird jedoch der von uns vorgeschlagene Latextest angewendet, so reicht diese Menge Kalbsthymusextrakt für immerhin 90 Proben. Daher ist der Latex-Test deutlich weniger aufwendig und sein Ergebnis ist bereits nach 10 - 15 min ablesbar. Folglich ist der Latex-Test das bisher einfachste und schnellste Verfahren zum Nachweis von Sm-Antikörpern.

Es muß allerdings hinzugefügt werden, daß der Latextest durch die bereits weiter oben erwähnte Leer-Latexprobe als Kontrolle überprüft werden sollte, um falsch positive Reaktionen ausschließen zu können.

Für den Nachweis von DNP-Antikörpern benötigt man mit dem Latex-Agglutinationstest sogar nur eine min (11). Der Grund dafür ist wahrscheinlich, daß viele inaktivierte andere Non-Histon-nukleär-Protein-Antigene dabei die Absorptionsstellen der Latex-Oberfläche besetzen.

Voraussetzung für ein gutes Ergebnis beim Latextest ist ein gereinigtes Antigen. Wird entsprechend den Angaben von Takano et al. (62) das Sm-Antigen weiter gereinigt, könnte mit diesem Antigen möglicherweise ein noch besseres Latex-Reagens produziert werden.

4.2.2. Sensitivität und Spezifität der Methode

Wie bereits ausgeführt, enthält der hitzebehandelte Kalbsthymusextrakt nur Sm-Antigen. Chen wies 1982 nach (8), daß die Effekte von Hitze- und RNase-Behandlung gleich gut waren. Die Korrelation betrug 89/91 ($97,8 \pm 1.5\%$). Deshalb ist als einfache und zuverlässige Methode die alleinige Hitzebehandlung zur Reinigung des Sm-Antigens ausreichend, wie wir an unseren 70 Proben im Vergleich mit der Doppel-Immun-diffusion (Korrelationskoeffizient = 1) belegen konnten.

Der Latex-Agglutinationstest ist demnach durchaus auch für semiquantitative Messungen geeignet. Sm-positive Kontrollsera wurden bis zu Titern von 1 : 2560 untersucht und waren durchweg positiv (Abb. 6), was die sehr hohe Empfindlichkeit des Testsystems bestätigt.

4.2.3. Beschichtungsbedingungen

Beim ELISA-Verfahren zum Nachweis von Sm-Antikörpern spielen die Beschichtungsbedingungen keine nennenswerte Rolle, ausgenommen die Antigenkonzentrationen (61). Die Ergebnisse werden durch Modifikationen praktisch nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu müssen für den Latextest die Beschichtungsbedingungen optimiert werden, wie wir in Vorversuchen feststellen konnten. So waren unter folgenden Konditionen sämtliche Ergebnisse negativ: pH 7.6; Temperatur 24° , 37° , 50° C; Beschichtungszeit 45 min, 60 min, 24 Std.

Es empfiehlt sich, vor Etablierung eines Testsystems durch orthogonale Versuchsanordnungen die optimalen Reaktionsbedingungen für das jeweilige Labor festzulegen.

4.3. Klinische Bedeutung

4.3.1. Sm-Antikörper und andere Erkrankungen

Obgleich der Sm-Antikörper ein "Marker"-Antikörper für SLE ist, gibt es auch positive Reaktionen bei anderen Krankheiten, z. B. bei MCTD (7%), bei Sklerodermie (4%), bei Dermatomyositis (4%) (57), und auch beim Still-Syndrom kann der Test positiv sein (63). Ausnahmsweise trifft dies für Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis, chronischer Nephritis, Eisenmangelanämie und Tuberkulose zu (13,14,25). Sharp (57) folgerte daraus, daß es keinen (Auto-) Antikörper bei nur ausschließlich einer Krankheit gibt. Dennoch muß nach bisher vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, daß Sm-Antikörper bei SLE diagnostisch führend sind (28-75%) (16,42, 54,63).

4.3.2. Beziehung zwischen Sm-Antikörper und Ausmaß der klinischen Organbeteiligung bei SLE

Tojo (68) wies anhand von Untersuchungen an 160 Patienten mit SLE darauf hin, daß zwischen Autoantikörpern und klinischen Symptomen eine positive Korrelation zu Proteinurie, erniedrigtem Komplement, Muskelschmerz, Muskelschwäche, Erythem, Heliotropie, Raynaud-Phänomen und Alopezie bestehen soll. Winfried et al. (71) berichteten, daß 71% der SLE-Patienten mit einer Beteiligung des Zentralnervensystems Sm-Antikörper hatten. Während Winn et al. (73) dies bestätigten, wurde von Reinitz et al. (50) über gegensätzliche Erfahrungen berichtet. Letztere zeigten, daß Patienten mit Sm-Antikörpern nur in 14% (6/44) neuropsychiatrische Symptome hatten und 20% (13/60) ohne Sm-Antikörper ebenfalls.

Nach unseren Erfahrungen gibt es keine Beziehungen zwischen Sm-Antikörpern und einer Zentralnervensystembeteiligung.

Power et al. (44) wies darauf hin, daß SLE-Patienten mit Sm-Antikörpern oftmals eine Nierenbeteiligung hatten, im Gegensatz zu der bereits zitierten Autorengruppe Winn et al. (73).

Kurata et al. (27) führten bei unbehandelten SLE-Patienten Nierenbiopsien durch und fanden, daß Sm-Antikörper in Beziehung zu den immunpathologischen Veränderungen an den gefäßführenden Bindegewebsanteilen bzw. den membranösen Typen der Glomerulonephritiden stehen. SLE-Erkrankungen dieser Art verlaufen schwerer als die sogenannten lineären Typen der Glomerulonephritiden, die oft bei Patienten mit RNP-Antikörpern vorkommen, und leichter als die granulären oder "lumpy" Typen der Glomerulonephritiden, die oft bei Patienten mit ds-DNA-Antikörpern erscheinen (Tab. 7).

Tab. 7 Verbindung von Fluoreszenzmuster und Niereninsuffizienz

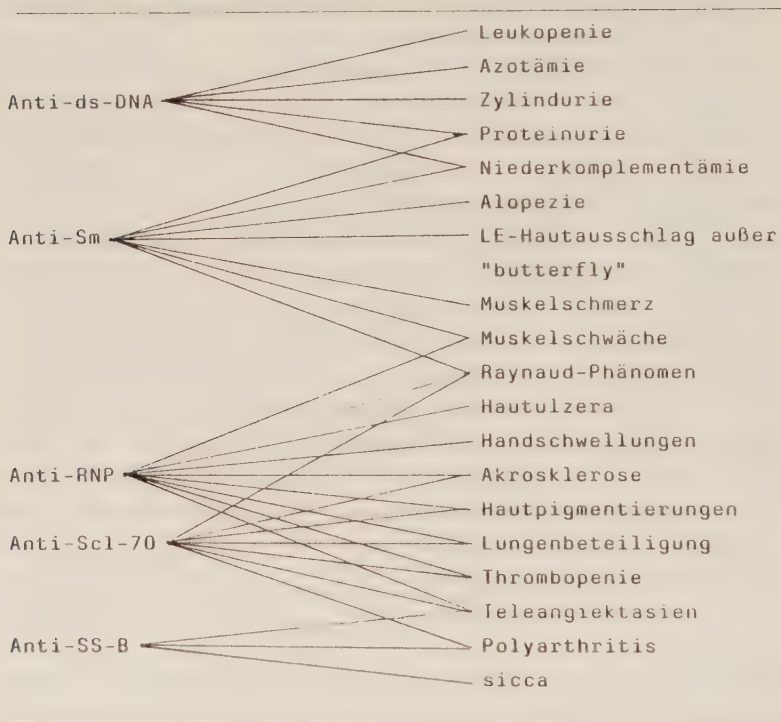
Fluoreszenzmuster	Proteinurie	Niereninsuffizienz
 lineäres Muster	(-)	(-)
 "mesangiales" Muster	(-) oder zeitlich	(-)

Fluoreszenzmuster	Proteinurie	Niereninsuffizienz
	membranöses Muster	(+) dauernd
	granuläres Muster	(+) dauernd
	"lumpy" Muster	(+) dauernd

4.3.3. Beziehungen zwischen ANA und CTD

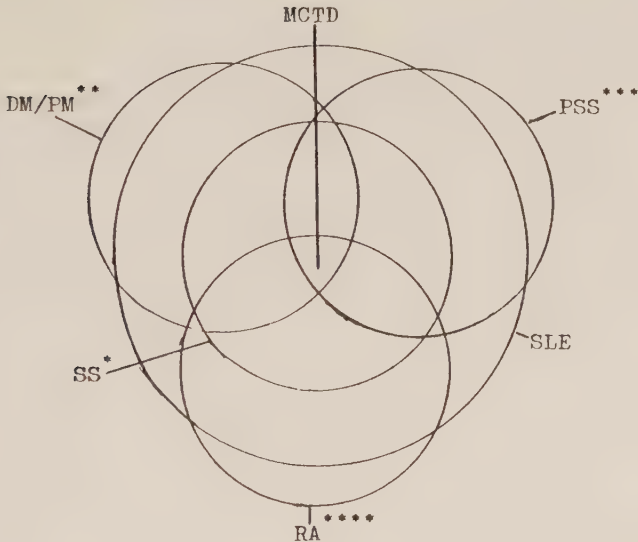
Nach heutiger Auffassung können Sm-Antikörper mit verschiedenen klinischen Symptomen korreliert sein, wie übrigens auch andere ANAs (Tab. 8).

Tab. 8. ANAs und klinische Erscheinungen



Hat nun ein Patient zwei oder mehrere ANAs, so werden die klinischen Symptome, die in Korrelation zu verschiedenen Antikörpern stehen, gewöhnlich zusammengezählt. Nach unserer Auffassung sollte jedoch der jeweilige Typ der ANAs berücksichtigt werden, woraus sich für die klinische Diagnostik folgende Leitlinien ableiten lassen (Abb. 11) (10):

Abb. 11 CTD-Spektrum (Überlappungsmöglichkeiten)



* Sjögren Syndrom

** Dermatomyositis/Polymyositis

*** progressive systemische Sklerodermie

**** rheumatische Arthritis

Bei der CTD sind die ANAs natürlich nicht Ursache der Erkrankung, was alleine schon daraus hervorgeht, daß mit verschiedenen Methoden ANAs in Versuchstieren oder in vitro produziert werden können (15,26,39,60,70). Dennoch lassen sich mit differenzierenden Verfahren zur Bestimmung von ANAs in Verbindung mit solchen der humoralen Immunveränderungen die Diagnosen sicherer stellen und klinische Untergruppen klassifizieren (45,55). Gleiches gilt für die prognostische Einschätzung von CTD, die Auswahl der geeigneten Behandlungsverfahren und deren Kontrolle.

So haben die ANAs nicht nur eine Bedeutung für die Forschung, sondern in erster Linie auch für die klinische Medizin.

Zusammenfassung

Der Sm-Antikörper ist nahezu immer bei SLE nachweisbar und wird daher als "Marker"-Antikörper und Klassifikationskriterium (ARA 1982) gewertet. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Latex-Agglutinationstest zum Nachweis des Sm-Antikörpers vorgestellt. Seine hohe Korrelation mit dem Immundiffusionsverfahren ($r = 1$) beweist die große Spezifität und Sensitivität des Tests. Dieses neue Verfahren besitzt außerdem folgende Vorteile: Es ist wenig aufwendig, einfach und schnell durchführbar, und es sind keine radioaktiven "Marker"-Substanzen nötig. Das Antigen aus Kalbsthymusextrakten konnte dahingehend charakterisiert werden, daß das Sm-Antigen resistent gegen Hitzebehandlung (56°C , drei Std.) und empfindlich gegenüber Trypsin-Behandlung ist. Dagegen ist das Antigen aus Kalbsthymusextrakt, das auf SS-B-positive Kontrollsera reagiert, kein echtes SS-B-, sondern ein Ha/la-Antigen. Struktur, physikalische, biochemische und immunologische Eigenschaften, ferner die Nomenklatur und die Ursprungsgewebe des Sm-Antigens sowie die Nachweismethoden von Sm-Antikörpern und ihre klinische Bedeutung werden ausführlich diskutiert.

Literatur

1. Aarden LA, de Groot ER and Feltkamp TE: Crithidia luciliae a simple substrate for the detection of anti-ds-DNA with the immunofluorescence technique. Ann.N.Y.Acad.Sci. 254: 505-515, 1975.
2. Alspaugh MA and Tan EM: Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. 55 : 1067-1073, 1975.
3. Alspaugh MA, Talal N and Tan EM: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 19 : 216-222, 1976.
4. Alspaugh MA and Tan EM: Serum antibody in rheumatoid arthritis reactive with a cellassociated antigen. Arthritis Rheum. 19 : 711-719, 1976.
5. Alspaugh MA and Maddison P: Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration. Arthritis Rheum. 22 : 796-798, 1979.
6. Arai H, et al.: Crithidia method for the determination of anti- dsDNA antibody with the immunofluorescence technic: a preliminary report. Clin. Immunol. 10 : 403 - 413, 1978. (Japanisch).
7. Billings PB, Allen RW, Jensen FC and Hoch SO: Anti-RNP monoclonal antibodies derived from a mouse strain with lupus like autoimmunity. J. Immunol. 128 : 1176-1180, 1982.
8. Chen Deli: Magisterarbeit. Nichtpublizierte Literatur (Chinesisch).
9. Dai Yulin, Xu Wenyan et al.: Indirect immunofluorescence detection of anti-dsDNA antibody with mouse liver imprint treated by acetone and hydrochloric acid. Natl. Med. J. China. 64 : 203-205, 1984. (Chinesische und englische Zusammenfassung).
10. Dai Yulin und Xu Wenyan: Gemischte Bindegewebserkrankung ist eine Krankheitsentität. J. Clin. Med. 1 : 55 - 57, 1985. (Chinesisch).
11. Dai Yulin, Wang Huizhen, Xu Wenyan and Jin Wanqin: Detection of anti-deoxyribonucleoprotein antibody with latex test. Acta Acad. Med. Sinicae. 7:388-392, 1985. (Chinesische und englische Zusammenfassung).

12. Deng J, Sontheimer RD, Lipscomb MF and Gilliam JN: The binding of antihistone antibodies to Crithidia luciliae kinetoplasts is growth cycle-dependent. Arthritis Rheum. 28 : 163-168, 1985.
13. Farber SJ and Bole GG: Clinical features of patients with antibody to extractable nuclear antigen (ENA). Arthritis Rheum. 18 : 397-397, 1975.
14. Farber SJ and Bole GG: Antibodies to components of extractable nuclear antigen. Arch. Intern. Med. 136:425 - 431, 1976.
15. Goldman M, Feng HM, Enger SH et al.: Autoimmunity and immune complex disease after neonatal induction of transplantation tolerance in mice. J. Immunol. 131 : 251-257, 1983.
16. Hamburger M, Hodes S, Barland P: The incidence and clinical significance of antibodies to extractable nuclear antigen. Am. J. med. Sci. 273 : 21-28, 1977.
17. Hargraves MM, Richmond H, Morton R: Presentation of two bone marrow elements: the "tart" cell and the "LE" cell. Mayo. Clin. Proc. 23 : 25-28, 1948.
18. Hardin JA: the lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 29 : 457-460, 1986.
19. Haserick JR, Lewis LA, Bortz DW: Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus 1. determination of gamma globulin as specific plasma fraction. Am. J. Med. Sci. 219 : 660-663, 1950.
20. Holman HR, Kunkel HG: Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. Science. 126 : 162-163, 1957.
21. Holman HR: The LE cell and the LE serum factors Bull. N. Y. Acad. Med. 35 : 409-418, 1959.
22. Holman HR: Partial purification and characterization of an extractable nuclear antigen which reacts with SLE sera. Ann. N. Y. Acad. Sci. 124 : 800-806, 1965.
23. Karlson P: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 10. durchgesehene Auflage. Seite 138. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.
24. Käser O, Friedberg V, Ober KG, Thomasen K, Zander J: Gynäkologie und Geburtshilfe. Band 1. Seite 852-853. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 1969.

25. Keiser HD and Weinstein J: The detection and identification of antibodies to saline extractable nuclear antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum.* 23 : 1026-1035, 1980.
26. Kumagai Y, Shiokawa Y, Medsger JA and Rodnan GP: Clinical spectrum of connective tissue disease after cosmetic surgery. *Arthritis Rheum.* 27 : 1-12, 1984.
27. Kurata N et al.: Symposium on renal involvement in systemic diseases III. lupus erythematosus (1) immunopathological study on lupus nephritis. *J. Jap. Inn.Med. Acad.* 68 : 1250-1253, 1979. (Japanisch).
28. Lachmann PJ and Kunkel HG: Correlation of antinuclear antibodies and nuclear staining patterns. *Lancet.* 2 : 436-437, 1961.
29. Lakomek H-J, Sablotni N, Hagedorn H-J, Krüskemper HL: Vergleich der Eignung von vier Methoden (Immunfluoreszenz antinukleärer Antikörper, indirekte Hämagglutination, Immundiffusion, Gegenstromimmunelektrophorese) zur Differenzierung und Identifizierung von nukleärem Antigen. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21 : 621-632, 1983.
30. Lerner MR and Steitz JA: Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 5495-5499, 1979.
31. MacCarty GA, Valencia DW, Frizler MJ: Antinuclear antibodies, contemporary techniques and clinical application to connective tissue diseases. Oxford University Press New York Oxford 1984.
32. MacGillivray AJ, Dahi S, Naxakis G and Wallis CM: Nuclear protein antigens in autoimmune rheumatic and connective tissue diseases. *Cell. Biol. Intern. Reports.* 5 : 69-72, 1981.
33. Mandel MJ, Carr RI, Weston WL et al.: Anti-native DNA antibodies in discoid lupus erythematosus. *Arch. Dermatol.* 106 : 668-670, 1972.
34. Mattioli M and Reichlin M: Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera. *J. Immunol.* 107 : 1281-1290, 1971.
35. Mattioli M and Reichlin M: Physical association of two nuclear antigens and mutual occurrence of their antibodies: the relationship of the Sm and RNA protein (Mo) systems in SLE sera. *J. Immunol.* 110 : 1318-1324, 1973.

36. Mattioli M and Reichlin M: Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 17 : 421-429, 1974.
37. Mimori M, Akizuki M, Yamagata H et al. : Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.* 68 : 611-620, 1981.
38. Miehls K, Kruppa KH, Schimanski J: Die serologischen Reaktionen zum Nachweis des Rheumafaktors. *MMW* 8 : 382-386, 1960.
39. Mumford P, Room GRW, Venables PJW and Maini RN: IgG antibodies to SS-B (La), RNP/Sm and DNA are produced by PWM-stimulated normal human lymphocytes in culture. *Rheumatol. Int.* 5 : 109-112, 1985.
40. Nishikai M and Reichlin M: Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis. Characterization of the Jo-1 antibody system. *Arthritis Rheum.* 23 : 881-888, 1980.
41. Nishikai M and Reichlin M: Purification and characterization of a nuclear nonhistone basic protein (Mi-1) which reacts with antiimmunoglobulin sera and the sera of patients with dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17 : 1129-1141, 1980.
42. Notman DD, Kurata N and Tan EM, Jolla L: Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann. Intern. Med.* 83 : 464-469, 1975.
43. Pettersson I, Hinterberger M, Mimori T et al.: The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. *J. Biol. Chem.* 259 : 5907-5914, 1984.
44. Powers R, Akizuki M, Boehm-Truitt MJ et al.: Substantial purification of the Sm antigen and association of high titer antibody to Sm with a clinical subset of systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum.* 20 : 131-131, 1977.
45. Provost TT: Subsets in systemic lupus erythematosus. *J. Invest. Dermatol.* 72 : 110-113, 1979.
46. Puhan N und Werner H: Über die Eignung eines latex-Schnelltestes zum Nachweis einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* im Vergleich mit dem Sabin-Feldman-Test. *Ärztl. Lab.* 24 : 170-179, 1978.

47. Reeves WH, Fisher DE, Wisniewolski R, Gottlieb AB and Chiorazzi N: Psoriasis and Raynaud's Phenomenon associated with autoantibodies to U1 and U2 small nuclear ribonucleoproteins. *N. Eng. J. Med.* 315 : 105-111, 1986.
48. Reichlin M and Mattioli M: Description of a serological reaction characteristic of polymyositis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 5 : 12-20, 1976.
49. Reihsen J, Parks R, Kovacs S and Agris P: An approach to identification of RNP and Sm polypeptide antigenic determinants. *Arthritis Rheum.* 29 : s104-s104, 1986.
50. Reinitz E, Grayzel A and Barland P: Specificity of Sm antibody. *Arthritis Rheum.* 23 : 869-869, 1980.
51. Sabharwal UK, Fong S, Hoch S et al.: Complement activation by antibodies to Sm in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 51 : 317-324, 1983.
52. Seeling HP: Antikörper gegen Zellkernantigene. Stuttgart 1983.
53. Schur PH and Sandson J: Immunological factors and clinical activity in SLE. *N. Eng. J. Med.* 278 : 533-538, 1968.
54. Scopelitis E, Biundo JJ, and Alspaugh MA: Anti-SS-A antibody and other antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23 : 287-293, 1980.
55. Sharp GC, Irvin WS and La Rogue RL: Association of autoantibodies to different nuclear antigens with clinical patterns of rheumatic disease and responsiveness to therapy. *J. Clin. Invest.* 50 : 350-359, 1971.
56. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM et al.: Mixed connective tissue disease - an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52 : 148-159, 1972.
57. Sharp GC: Mixed connective tissue disease - overlap syndromes. *Clin. Rheum. Dis.* 1 : 561-562, 1975.
58. Singer JM and Plotz CM: The latex fixation test. 1, Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* 21 : 888-892, 1956.
59. Steinmetz SE, Deng JS, Rubin RL et al.: Reevaluation of specificity of *Crithidia luciliae* kinetoplast as a substrate for detecting antibodies to double-stranded deoxyribonucleic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 11 : 490-493, 1984.

60. Strongwater SL, Dorovini ZIK, Ball RD and Schnitzer TJ: A murine model of polymyositis induced by coxsackievirus B1(Tucson strain). *Arthritis Rheum.* 27 : 433-442, 1984.
61. Struckmann J, Manthorpe R and Bendixen G: Anti-ENA antibody in serum determined by ELISA-technique. *Allergy.* 36 : 397-403, 1981.
62. Takano M, Golden SS, Sharp GC and Agris PF: Molecular relationship between two nuclear antigens, ribonucleoprotein and Sm: Purification of active antigens and their biochemical characterization. *Biochem.* 20 : 5929-5935, 1981.
63. Tan EM and Kunkel GH: Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 96 : 464-470, 1966.
64. Tan EM and Rodnan GP: Profile of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis (PSS). *Arthritis Rheum.* 18 : 430-430, 1975.
65. Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Advances Immunol.* 33 : 167-240, 1982.
66. Tan EM, Cohen AS, Fries J et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25 : 1271-1277, 1982.
67. Thomas L: Labor and Diagnose. Zweite Auflage. Seite 609 Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn 1984.
68. Tojo T: Antibodies to nonhistone nucleoproteins in SLE. *Clin. Immunol.* 11 : 417-424, 1979. (Japanisch).
69. Treadwell EL, Alspaugh MA and Sharp GC: Characterization of a new antigen-antibody system (Su) in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 27: 1263-1271, 1984.
70. Van Nunen SA, Gatenby PA and Basten A: Postmammaplasty connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* 25 : 694-697, 1982.
71. Winfield JB, Brunner CM and Koffler D: Serologic studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction. *Arthritis Rheum.* 21 : 289-294, 1978.
72. Winn DM, Wolfe JF, Harmon D and Sharp GC: Characterization of a distinct nuclear acidic protein antigen (MA)

- and clinical findings in systemic lupus erythematosus patients with MA antibodies. J. Clin. Invest. 64 : 820-823, 1979.
73. Winn DM, Wolfe JF, Lindberg DA et al.: Identification of a clinical subset of systemic lupus erythematosus by antibodies to the Sm antigen. Arthritis Rheum. 22 : 1334-1336, 1979.
74. Wold RT, Young FE, Tan EM and Farr RS: Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect it's primary interaction with deoxyribonucleic acid. Science. 161 : 806-807, 1968
75. Wolfe JF, Adelstein E and Sharp GC: Antinuclear antibody with distinct specificity for polymyositis. J. Clin. Invest. 59 : 176-178, 1977.
76. Xu Shizheng and Wang Huizhen: A new method for determination of anti-double stranded DNA antibodies. Chin. J. Med. (Engl.) 94 : 549-554, 1981.
77. Xu Wenyan, Dai Yulin et al.: Extraction of the nonhistone nuclear antigen from pig thymus. Nichtpublizierte Literatur (Chinesisch).

Danksagung

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr.Dr.med.habil. B.-R. Balda, möchte ich für die freundliche Aufnahme als Doktorand in seine Klinik und für die fortwährende Förderung und Anregung der vorgelegten Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Für die Hilfe bei den mikroskopischen Aufnahmen danke ich Herrn Dr. D. Rosenzweig.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. H. Wagener und den Mitarbeitern des Zentrallabors für ihre freundliche Unterstützung.

Dank auch an alle jenen, die mir bei der Fertigstellung der Arbeit geholfen haben.

Der Hanns-Seidel-Stiftung möchte ich für die Förderung meiner wissenschaftlichen Fortbildung, die Grundlage dieser Arbeit ist, danken.

Lebenslauf

Am 1. April 1947 wurde ich als Sohn der Eheleute Dai Quiying und Zhuang Aiquing in Fujian Chinas geboren.

Von September 1952 bis Juli 1958 besuchte ich die Volksschule in Zhenjiang und Nanjing. Von September 1958 bis Juli 1964 besuchte ich das Gymnasium in Nanjing und Xuzhou. Im Juli 1964 legte ich dort das Abitur ab.

Nach einer staatlichen Prüfung studierte ich in Nanjing an der Medizinischen Fakultät. Im Jahre 1970 beendete ich das Medizinstudium, danach arbeitete ich zwei Jahre als Allgemeinarzt in einem Kommunalkrankenhaus. Im Jahr 1973 absolvierte ich die Fortbildung für Chirurgie an der Medizinischen Fakultät Xuzhou. Im Jahr 1974 schloß ich die Fortbildung für Dermatologie ab, ebenfalls an der Medizinischen Fakultät Xuzhou. Danach arbeitete ich als Dermatologe im Xinyi Volkskrankenhaus.

Im Jahr 1978, nach zwei Prüfungen, studierte ich drei Jahre als Aspirant für den Magister wiederum an der Medizinischen Fakultät Nanjing. Nach der Dissertation erlangte ich die medizinische Magisterwürde.

Seit 1982 arbeite ich im Forschungsinstitut für Dermatologie der Chinesischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften. Ich hatte Gelegenheit, für drei Monate am Forschungsinstitut für Dermatologie in Bangkok, Thailand tätig zu sein.

Seit April 1985 bin ich Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung bei Herrn Professor Dr. Balda in der Klinik für Dermatologie und Allergologie im Zentralklinikum Augsburg.

